不同粗饲料条件下梅花鹿瘤胃甲烷菌结构的比较分析

李志鹏　刘晗璐　司华哲　鲍　坤　李光玉*[1]

（中国农业科学院特产研究所经济动物研究室，长春 130112）

摘　要：本研究旨在基于高通量测序技术分析比较采食 3 种常见粗饲料梅花鹿瘤胃甲烷菌结构。选取 3 只 2 岁龄的装有永久性瘤胃瘘管的成年雄性梅花鹿为研究对象，采用 3×3 拉丁方设计，分别饲喂以柞树叶（OL 组）、玉米秸秆（CS 组）和玉米青贮（CI 组）为主要粗饲料的饲粮。预试期 1 周，正试期为 4 周。采用引物 A519F、A976R 扩增瘤胃甲烷菌 16S rRNA 基因 V3～V4 区，基于 Illumina Miseq PE250 平台进行测序。结果表明：9 个样本共获得 600 352 条高质量的甲烷菌 16S rRNA 基因序列，基于 97%相似性共归为 111 个分类操作单元（OTU）。覆盖度指数（Good's overage）表明本试验样品覆盖了瘤胃 99%的甲烷菌。分类分析结果表明 *Methanobrevibacter* spp.[OL 组：（97.80±6.00）%；CS 组：（97.10±1.50）%；CI 组：（87.50±5.50）%]是梅花鹿瘤胃优势甲烷菌，但采食 3 种粗饲料梅花鹿瘤胃甲烷菌在种水平的分布有差异。CI 组 *Methanosphaera stadtmanae* 相对丰度显著高于 OL 组与 CS 组（P<0.05）。OL 组与 CI 组 *Methanobrevibacter millerae* 相对丰度高于 CS 组（P>0.05），OL 组与 CS 组 *Methanobrevibacter boviskoreani* 丰度高于 CI 组（P>0.05），而 CS 组与 CI 组 *Methanobrevibacter olleyae* 相对丰度高于 OL 组（P>0.05）。本研究发现 *Methanobrevibacter* spp. 是梅花鹿瘤胃优势甲烷菌。

关键词：梅花鹿；甲烷菌；*Methanobrevibacter* spp.；粗饲料

中图分类号：S852.6　　文献标识码：A　　文章编号：

甲烷是一种与全球气候变化密切相关的温室气体。据统计，畜牧业贡献了全球 9%～18%的温室气体排放，其中反刍动物排放占有率为 80%，同时反刍动物的甲烷形成过程也导致机体损失 2%～12%的净能量[1-2]。因此，反刍动物的甲烷排放越来越受到人们的关注。对反刍动物而言，甲烷主要是由瘤胃甲烷菌利用饲料消化过程中所产生的中间代谢产物，如氢气、甲酸、甲醇及甲胺等，还原二氧化碳而生成的。因此，研究反刍动物瘤胃甲烷菌结构能够为

收稿日期：2016-03-03

基金项目：国家自然科学基金（31501984）；吉林省重大科技攻关专项（20140203018NY）

作者简介：李志鹏（1984-），男，陕西蒲城人，助理研究员，硕士，从事经济动物微生物与营养研究。E-mail: zhplicaas@163.com

*通信作者，李光玉，研究员，博士生导师，E-mail: tcslgy@126.com

甲烷调控提供依据。梅花鹿（*Cervus nippon*）是我国的一种珍稀名贵鹿科反刍动物，鹿茸是成年梅花鹿的主要产品，具有很高的药用经济价值。因此，研究梅花鹿瘤胃甲烷菌结构有助于了解甲烷菌在梅花鹿瘤胃生态中的作用。目前，国内外学者基于非培养技术已经研究了多种反刍动物瘤胃甲烷菌结构，结果表明宿主特异性可能是影响瘤胃甲烷菌结构的一个重要因素[3-4]。本实验室前期研究发现普雷沃氏菌属（*Prevotella* spp.）是梅花鹿瘤胃优势细菌[5]，而瘤胃细菌是为甲烷菌生长提供底物的一类重要微生物。因此，梅花鹿瘤胃可能栖息着独特的甲烷菌群落结构。另外，饲粮组成也显著影响着瘤胃甲烷菌组成及丰度。玉米秸秆和玉米青贮是家养梅花鹿常用粗饲料，柞树叶是放牧条件下梅花鹿喜欢采食的一种富含单宁的粗饲料。本实验室前期研究发现富含单宁的植物饲料降低反刍动物甲烷产量并影响其瘤胃甲烷菌结构[6]。这表明采食柞树叶、玉米秸秆和玉米青贮这 3 种粗饲料的梅花鹿的瘤胃甲烷菌结构可能有所不同。因此，本研究拟对采食上述 3 种粗饲料的梅花鹿的瘤胃甲烷菌结构进行比较分析，旨在为调控梅花鹿瘤胃甲烷产量提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　试验动物及样品采集

选取 3 只 2 周岁的装有永久性瘤胃瘘管的成年雄性梅花鹿为研究对象，平均体重 120 kg，单只单圈饲养于中国农业科学院特产研究所茸鹿试验基地。采用 3×3 拉丁方设计，3 只试验动物分别饲喂以柞树叶（OL 组）、玉米秸秆（CS 组）和玉米青贮（CI 组）为粗饲料的饲粮，每只梅花鹿每天饲喂相同精饲料 2.0 kg，粗饲料在饲粮中约占 50%（干物质基础），饲料组成及营养水平见表 1。试验动物每天定时定量饲喂 2 次，自由饮水。每只试验动物每种粗饲料预饲 1 周，正试期为 4 周。试验期末通过瘤胃瘘管采集瘤胃内容物（约为 200 g），置于冰盒中迅速带回实验室，保存于-80 ℃冰箱备用。

表 1　饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of the diet (air-dry basis) %

项目 Items	组别 Groups		
	OL	CS	CI
原料 Ingredients			
玉米粉 Corn flour	32.25	32.25	32.25

豆粕 Soybean meal	9.85	9.85	9.85
玉米干酒糟及其可溶物 Corn DDGS	6.40	6.40	6.40
食盐 NaCl	0.50	0.50	0.50
预混料 Premix[1)]	1.00	1.00	1.00
柞树叶 Oak leaf	50.00		
玉米秸秆 Corn stover		50.00	
玉米青贮 Corn silage			50.00
合计 Total	100.00	100.00	100.0
营养水平 Nutrient levels[2)]			
代谢能 ME/（MJ/kg）	13.24	13.54	12.97
粗蛋白质 CP	17.25	14.53	15.26
中性洗涤纤维 NDF	30.50	41.88	39.87
钙 Ca	0.91	0.98	1.13
总磷 TP	0.46	0.47	0.61

[1)] 每千克预混料中含有 Contained the following per kg of premix: MgO 7.6 g，$ZnSO_4$ 3.6 g，$MnSO_4 \cdot H_2O$ 4.3 g，$FeSO_4 \cdot H_2O$ 5.3 g，$NaSeO_3$ 3.1 g，$CaHPO_4$ 517 g，VA 248 400 IU，VB_1 0.0092 g，VB_2 0.069 g，VB_{12} 0.138 mg，VD_3 496.8 IU，VE 82.8 IU，VK_3 0.023 g，叶酸 folic acid 2.3 mg，泛酸钙 calcium pantothenate 115 g，烟酸 nicotinic acid 0.162 g。

[2)] 实测值 Measured values。

1.2 瘤胃内容物总基因组 DNA 提取

采用珠磨与 QIAGEN 试剂盒相结合的方法提取瘤胃内容物总基因组 DNA。具体方法如下：称取约 0.2 g 瘤胃内容物至灭菌后的离心管中，加入约 0.7 g 直径为 0.2 mm 的硅珠和 1.4 mL ASL 溶液；混合样品迅速置于 FastPrep®-24（MP Biomedicals）以 6.5 m/s 的速度振荡 45 s，之后按照粪便基因组 DNA 试剂盒说明进行操作。

1.3 PCR 扩增与 Illumina Miseq 测序

采用引物 A519F（5´-CAGCMGCCGCGGTAA-3´）和 A976R

（5´-CCGGCGTTGAMTCCAATT-3´）[7]扩增甲烷菌 16S rRNA 基因 V3～V4 区。PCR 产物纯化后送至上海美吉生物医药科技有限公司进行 PCR 产物定量、DNA 序列修饰、文库构建及 Illumina Miseq PE250 平台测序。

1.4　数据处理与生物信息学分析

对双端测序对原始数据进行质量控制，舍弃低质量序列（50 个连续碱基平均质量＜25、序列长度＜50 的序列）。采用软件 Flash 连接通过质量控制的序列对应的两端序列（错配率为 0)，获得分析序列。采用 QIIME1.7.0 软件包分析梅花鹿瘤胃甲烷菌多样性[8]。根据 barcode 信息对序列进行拆分，同时根据以下条件剔除低质量序列：1）序列最短长度为 400 bp，最长长度为 500 bp；2）50 个连续碱基最低质量为 25；3）barcode 序列最大错误数为 0；4）序列中同聚物最大长度为 6；5）引物错配率为 0。采用 Usearch61 根据 97%序列相似性将所有序列归为操作分类单元（operational taxonomic unit，OTU）[9]。OTU 代表序列与 Greengenes 数据库[10]进行 PyNAST 比对，采用 Chimera Slayer 软件去除嵌合体[11]。选取至少出现在 5 个样品中的 OTU 序列构建 OTU 表。选取每个 OTU 代表序列，利用 Blast 程序在 NCBI 中搜索相似性最高序列，对 OTU 序列进行分类。采用 QIIME1.7.0 软件包计算菌群丰富度指数（Chao1 指数）、覆盖度指数（Good’s coverage）及多样性指数[香农-威纳指数（Shannon-Wiener）指数和辛普森(Simpson)指数][8]。

以嗜热菌（*Aquifex pyrophilus*）为外群，选取 21 种甲烷菌 16S rRNA 基因序列和所有 OTU 代表序列，利用 MEGA 5.05 软件中的 ClustalW 比对后输出为同一长度序列，利用 Kimura-two 参数矩阵模型和邻接（neighbor-joining，NJ）法进行系统发育分析，设置 Bootstrap 值为 1 000[12]。FigTree v1.4.0 软件显示发育树。

1.5　统计分析

基于 SigmaPlot 12.0 软件采用三因素方差分析对不同组别甲烷菌的丰度进行显著性检验，甲烷菌丰度和多样性指数等数据结果表示为平均值±标准误，P<0.05 为差异显著。

2　结果与分析

2.1　测序结果与多样性指数

本试验中 9 个样本共获得 600 352 条高质量甲烷菌 16S rRNA 基因序列，每个样品的平均序列数为 66 705。以 97%序列相似性为阈值，600 352 个序列归为 111 个 OTU。样品覆盖

度指数表明试验所得 OTU 代表了瘤胃中 99%的甲烷菌，满足后续分析。3 组中丰富度指数（Chao1 指数）和多样性指数（Shannon-Wiener 指数和 Simpson 指数）无显著差异（P>0.05），但 CS 组与 CI 组 Shannon-Wiener 指数和 Simpson 指数较 OL 组有升高的趋势（表 2）。

表 2　高通量测序数据概况

Table 2　Summary of high throughput sequencing data

组别 Groups	每个样品序列平均数 Average sequences per sample	每个样品 OTU 平均数 Average OUT per sample	覆盖度指数 Good's coverage	香农-威纳指数 Shannon-Wiener index	辛普森指数 Simpson index	Chao 1 指数 Chao 1 index
OL	69 090	103	0.99	1.04	0.25	120.89
CS	60 937	100	0.99	1.56	0.39	126.06
CI	70 090	103	0.99	2.02	0.51	112.84

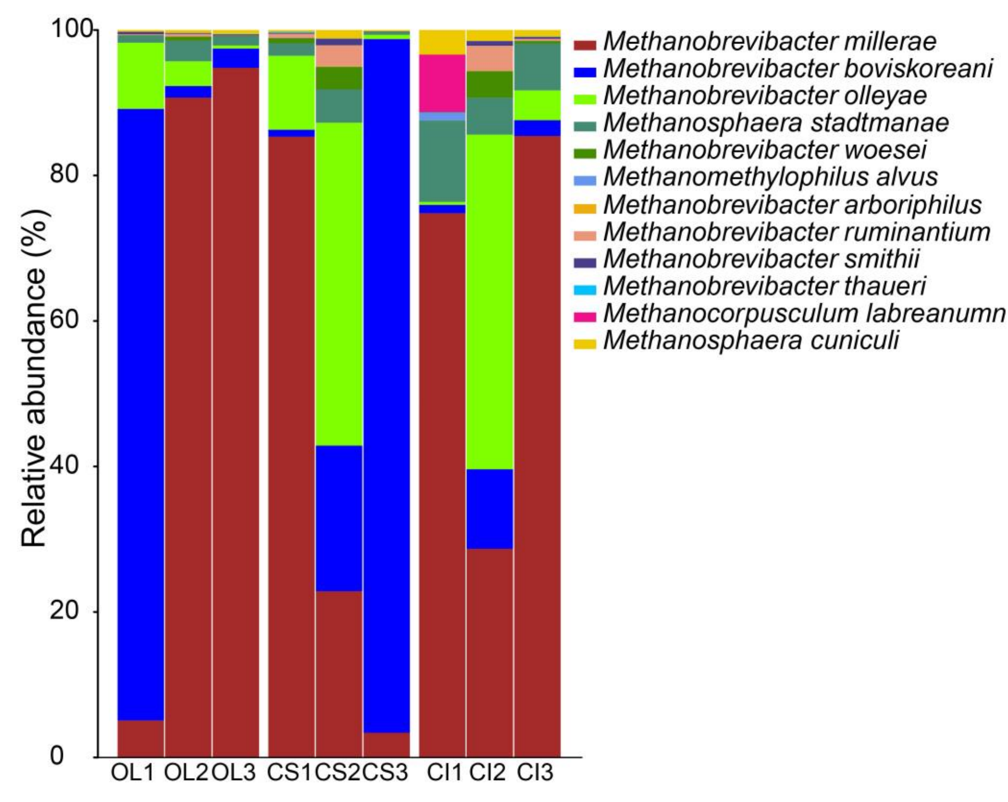
同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著(P>0.05)，不同小写字母表示差异显著(P<0.05)，不同大写字母表示差异极显著（P<0.01）。下表同。

In the same row, values with no or the same letter superscripts mean no significant difference (P>0.05), while with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05). The same as below.

2.2 采食不同粗饲料梅花鹿瘤胃甲烷菌组成

111 个 OTU 代表序列与 Genbank 数据库序列进行 Blast 分析，结果如图 1 所示。结果表明，这些序列归属为：甲烷短杆菌属（*Methanobrevibacter* spp.），OL 组、CS 组与 CI 组瘤胃中比例分别为（97.80±6.00）%、（97.10±1.50）%、（87.50±5.50）%；甲烷球菌属（*Methanosphaera* spp.），OL 组、CS 组与 CI 组瘤胃中比例分别为（2.09±0.51）%、（2.60±1.34）%、（9.40±2.45）%；甲烷粒菌属（*Methanocorpusculum* spp.），OL 组、CS 组与 CI 组瘤胃中比例分别为（0.01±0.01）%、（0.02±0.00）%、（2.60±2.00）%；*Methanomethylophilus* spp.，OL 组、CS 组与 CI 组瘤胃中比例分别为（0.01%±0.00）%、

（0.10%±0.01）%、（0.50±0.30）%。甲烷短杆菌属序列在种水平分类（表 3）发现，OL 组、CS 组和 CI 组中分别有（63.50±20.00）%、（37.20±20.00）%和（63.00±10.00）%的 OTU 与 *Methanobrevibacter millerae* 的 16S rRNA 相似（相似性：97%～99%）；OL 组、CS 组和 CI 组分别有（29.40±20.00）%、（38.80±20.00）%和（4.70±3.00）%的 OTU 与 *Methanobrevibacter boviskoreani* 的 16S rRNA 相似（相似性：95%～99%）；OL 组、CS 组和 CI 组分别有（4.30±2.00）%、（18.40±10.00）%和（16.80±10.00）%的 OTU 与 *Methanobrevibacter olleyae* 的 16S rRNA 相似（相似性：97%～98%）；OL 组、CS 组和 CI 组分别有（0.20±0.10）%、（1.30±0.90）%和（1.40±0.90）%的 OTU 与 *Methanobrevibacter woesei* 的 16S rRNA 相似（相似性：95%～97%）；OL 组、CS 组和 CI 组分别有（0.20±0.09）%、（1.10±0.80）%和（1.20±1.00）%的 OTU 与 *Methanobrevibacter ruminantium* 的 16S rRNA 相似（相似性：97%～99%）。甲烷球菌属中，OL 组、CS 组和 CI 组分别有（1.70±0.50）%、（2.20±1.00）%和（7.50±1.00）%的 OTU 与 *Methanosphaera stadtmanae* 的 16S rRNA 相似（相似性：96%～99%）；OL 组、CS 组和 CI 组分别有（0.39±0.09）%、（0.40±0.30）%和（1.90±0.70）%的 OTU 与 *Methanosphaera cuniculi* 的 16S rRNA 相似（相似性：95%～96%）。甲烷粒菌属中，OL 组、CS 组和 CI 组分别有（0.010±0.005）%、（0.020±0.004）%和（2.60±2.00）%的 OTU 与 *Methanocorpusculum labreanum* 的 16S rRNA 相似（相似性：98%）。另外，OL 组、CS 组和 CI 组中分别有（0.010±0.004）%、（0.100±0.010）%和（0.500±0.300）%的 OTU 与 Candidatus *Methanomethylophilus alvus* 的 16S rRNA 相似（相似性：93%～98%）。而且，CI 组中 *Methanosphaera stadtmanae* 相对丰度显著高于 OL 组与 CS 组（$P<0.05$）。



OL=柞树叶组，CS=玉米秸秆组，CI=玉米青贮组。

OL=Oak leaf group, CS=Corn stover group and CI=Corn silage group.

图 1　OL、CS 与 CI 组梅花鹿瘤胃甲烷菌平均相对丰度分布

Fig.1　The relative abundance distribution of methanogen on average in the rumen of sika deer in the OL, CS and CI groups

表 3　采食不同粗饲料梅花鹿瘤胃甲烷菌种水平组成

Table 3　Composition of methanogen at species level in the rumen of sika deer fed different forages　%

甲烷菌	组别 Groups		
Methanogens	OL	CS	CI
Mbr. millerae	63.50±20.00	37.20±20.00	63.00±10.00
Mbr. olleyae	4.30±2.00	18.40±10.00	16.80±10.00
Mbr. boviskoreani	29.40±20.00	38.80±20.00	4.70±3.00
Msp. stadtmanae	1.70±0.50[a]	2.20±1.00[a]	7.50±1.00[b]
Mbr. woesei	0.20±0.10	1.30±0.90	1.40±0.90
Mth. alvus	0.010±0.004	0.100±0.010	0.500±0.300

Mbr. arboriphilus	0.004±0.001	0.035±0.030	0.032±0.020
Mbr. ruminantium	0.20±0.09	1.10±0.80	1.20±1.00
Mbr. smithii	0.195±0.070	0.339±0.200	0.321±0.100
Mbr. thaueri	0.028±0.009	0.051±0.030	0.022±0.008
Msp. cuniculi	0.39±0.09	0.40±0.30	1.90±0.70
Mrp. labreanumn	0.010±0.005	0.020±0.004	2.600±2.000

Mbr.=Methanobrevibacter，*Msp.=Methanosphaera*，*Mth.=Methanomethylophilus*，*Mrp.=Methanocorpusculum*。图 2 同 The same as Fig.2。

2.3 梅花鹿瘤胃甲烷菌 16S rRNA 基因系统进化分析

系统发育分析(图 2)表明,111 个 OTU 聚为三大簇。99 个 OTU 与 *Methanobrevibacter* spp. 和 *Methanosphaera* spp.聚为一簇；OTU83 和 OTU84 与 *Methanomethylophilus alvus* 和 *Methanomassiliicoccus luminyensis* 聚为一簇；OTU79 与 *Methanocorpusculum labreanum* 聚为一簇。

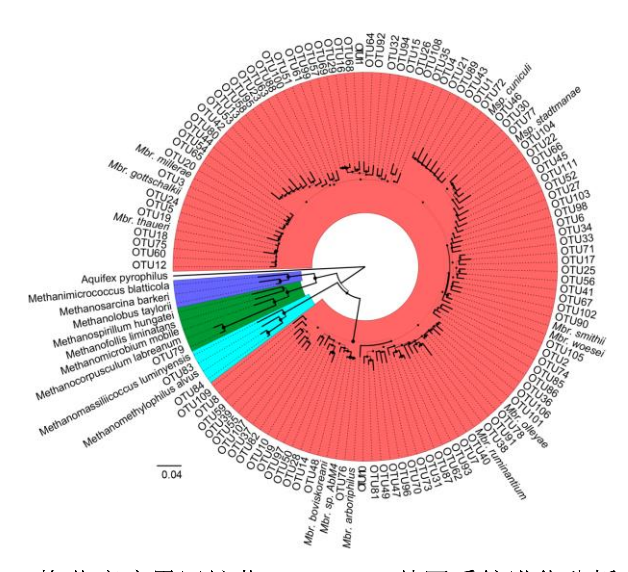


图 2 梅花鹿瘤胃甲烷菌 16S rRNA 基因系统进化分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of methanogen 16S rRNA genes from the rumen of sika deer

3 讨 论

瘤胃是自然界中多样且复杂的生态系统，其中栖息有大量的细菌、甲烷菌、真菌、原虫和少量噬菌体等。瘤胃微生物通过复杂的协同作用将饲料中的有机聚合物降解为单体并最终转化为挥发性脂肪酸、二氧化碳和氢气，其中挥发性脂肪酸是宿主的主要能量来源。瘤胃甲

烷菌能够利用二氧化碳作为碳源，氢作为主要的电子供体形成发酵副产物——甲烷。甲烷的生成能避免瘤胃氢气压强升高而引起的电子转移反应中微生物酶活性受到抑制，尤其是还原型辅酶Ⅰ脱氢酶（NADH）脱氢酶，当 NADH 积累一定程度会抑制瘤胃发酵的正常进行，因此甲烷的生成能够保证瘤胃发酵系统的有序进行[13]。然而，甲烷的形成不但会导致机体能量的损失，而且会产生温室效应[1-2]。因此，明确瘤胃甲烷菌结构对于理解瘤胃发酵及调控都具有重要意义。本研究首次采用高通技术深入研究了采食 3 种粗饲料梅花鹿瘤胃甲烷菌的结构，这一研究结果将为调控梅花鹿瘤胃甲烷生成，减少甲烷排放量提供依据。

首先，本研究发现梅花鹿瘤胃优势甲烷菌为 *Methanobrevibacter* spp.，这与国内外在其他草食动物，如委内瑞拉绵羊[14]、非洲野生黑斑羚[15]、北美地区荷斯坦牛[16-17]和中国德昌水牛瘤胃[18]等上的研究结果一致，表明 *Methanobrevibacter* spp.在草食动物前肠甲烷形成中起重要作用。其次，本研究证明 *Methanobrevibacter millerae* 是梅花鹿瘤胃优势甲烷菌，这与鹿科动物矮鹿的研究结果[7]相同，但与牛科反刍动物却有一定差异，比如，委内瑞拉绵羊瘤胃主要甲烷菌是 *Methanobrevibacter gottschalkii*[14]，北美荷斯坦牛[16-17]与挪威驯鹿瘤胃[19]优势甲烷菌是 *Methanobrevibacter ruminantium*，印度水牛[20]、中国青藏高原奶牛和牦牛瘤胃[21]瘤胃古菌 C 簇（RCC）最丰富，这些共性与差异性说明宿主特异性可能对瘤胃甲烷菌的种水平有显著影响。已有研究表明甲烷菌的发育型或菌株型在影响瘤胃甲烷生成量方面可能起着更为重要的作用[22]，然而，瘤胃甲烷产量又受到细菌型[23]及瘤胃体积大小[24]的影响。因此，这提示我们瘤胃甲烷产量的调控可能需要基于瘤胃微生态和宿主多角度考虑。*Methanobrevibacter millerae* 是一种能够以氢气或甲酸作为电子供体还原二氧化碳生成甲烷的甲烷菌[25]，而梅花鹿与矮鹿瘤胃优势细菌 *Prevotella* spp.是一类通过琥珀酸或丙烯酸途径利用氢气生成丙酸的细菌[26]。这说明瘤胃内氢气流转代谢可能是影响 *Methanobrevibacter millerae* 丰度的一个重要因素。有关 *Prevotella* spp.与 *Methanobrevibacter millerae* 之间的关系值得深入研究。RCC 是一类与 *Methanomassiliicoccus luminyensis* 和 Candidatus *Methanomethylophilus alvus* 相似性低的甲烷菌，它们在瘤胃中的比例大约为 15.8%[3]，能以甲胺类化合物或甲醇为底物生成甲烷，但不能利用二氧化碳，而且是调控反刍动物甲烷产量的目标甲烷菌[27-28]。RCC 在梅花鹿瘤胃的丰度不足 1%表明梅花鹿瘤胃甲烷产量可能较低。

其次，本研究发现粗饲料种类显著影响梅花鹿瘤胃甲烷菌结构。OL 组 *Methanosphaera*

spp.与 *Methanobrevibacter olleyae* 丰度低于 CS 组和 CI 组，这可能与柞树叶中含有单宁（含量：98 mg/kg）有关。研究发现瘤胃某些甲烷菌对单宁比较敏感，而且单宁对产甲烷菌生长所需的酶具有抑制作用。另外，饲粮中的单宁不但可与瘤胃内细菌细胞壁的碳水化合物形成复合物或与细胞结合性胞外酶发生反应抑制蛋白质降解菌的生长，而且能够与饲粮中蛋白质形成复合物从而降低蛋白质的降解[29]，这也与我们前期研究发现采食富含单宁柞树叶梅花鹿瘤胃异丁酸和异戊酸含量降低[5]的结果一致。由于 *Methanosphaera* spp.利用甲醇和氢气生成甲烷，不能单独利用二氧化碳或甲酸[30]，而 *Methanobrevibacter olleyae* 利用氢气或甲酸还原二氧化碳生成甲烷[25]，而且不同甲烷菌生长所需的氢气阈值也有所差异[31]。这表明饲粮在瘤胃降解过程中产生的氢气可能是影响甲烷菌组成的一个重要方面。此外，本试验中 CI 组 *Methanobrevibacter boviskoreani* 相对丰度低于 CS 组。研究发现 *Methanobrevibacter boviskoreani* 是一种利用氢气或甲酸产生甲烷的甲烷菌，其适宜生长 pH 为 6.5～7.0[32]。陶莲等[33]发现玉米秸秆经过青贮发酵后乳杆菌目细菌数量及乳酸和乙酸含量显著增加，而 pH 显著下降到 3.8。因此，CI 组较低的 pH 可能抑制了 *Methanobrevibacter boviskoreani* 的生长。

4 结 论

本研究发现 *Methanobrevibacter* spp.是梅花鹿瘤胃优势甲烷菌。

致谢：在试验过程中得到中国农业科学院特产研究所茸鹿试验基地技术人员的大力帮助，特此表示衷心感谢，同时也感谢 2 位审稿人对本文提出的宝贵建议。

参考文献：

[1] GILL M,SMITH P,WILKINSON J M.Mitigating climate change:the role of domestic livestock[J].Animal,2010,4(3):323–333.

[2] JOHNSON K A,JOHNSON D E.Methane emissions from cattle[J].Journal of Animal Science,1995,73(8):2483–2492.

[3] JANSSEN P H,KIRS M.Structure of the archaeal community of the rumen[J].Applied and Environmental Microbiology,2008,74(12):3619–3625.

[4] ST-PIERRE B,WRIGHT A D G.Diversity of gut methanogens in herbivorous animals[J].Animal,2013,7(Suppl.1):49–56.

[5] LI Z P,WRIGHT A D G,LIU H L,et al.Bacterial community composition and fermentation

patterns in the rumen of sika deer (*Cervus nippon*) fed three different diets[J].Microbial Ecology,2015,69(2):307–318.

[6] TAN H Y,SIEO C C,ABDULLAH N,et al.Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production,rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*[J].Animal Feed Science and Technology,2011,169(3/4):185–193.

[7] LI Z P,ZHANG Z G,XU C,et al.Bacteria and methanogens differ along the gastrointestinal tract of Chinese roe deer (*Capreolus pygargus*)[J].PLoS One,2014,9(12):e114513.

[8] CAPORASO J G,KUCZYNSKI J,STOMBAUGH J,et al.QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J].Nature Methods,2010,7(5):335–336.

[9] EDGAR R C.Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J].Bioinformatics,2010,26(19):2460–2461.

[10] DESANTIS T Z,HUGENHOLTZ P,LARSEN N,et al.Greengenes,a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB[J].Applied and Environmental Microbiology,2006,72(7):5069–5072.

[11] HAAS B J,GEVERS D,EARL A M,et al.Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons[J].Genome Research,2011,21(3):494–504.

[12] TAMURA K,PETERSON D,PETERSON N,et al.MEGA5:molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood,evolutionary distance,and maximum parsimony methods[J].Molecular Biology and Evolution,2011,28(10):2731–2739.

[13] HUNGATE R E.Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentation[J].Archiv für Mikrobiologie,1967,59(1/2/3):158–164.

[14] WRIGHT A D G,MA X L,OBISPO N E.*Methanobrevibacter* phylotypes are the dominant methanogens in sheep from Venezuela[J].Microbial Ecology,2008,56(2):390–394.

[15] CERSOSIMO L M,LACHANCE H,ST-PIERRE B,et al.Examination of the rumen bacteria and methanogenic archaea of wild impalas (*Aepyceros melampus melampus*) from Pongola,South Africa[J].Microbial Ecology,2015,69(3):577–585.

[16] HOOK S E,STEELE M A,NORTHWOOD K S,et al.Impact of high-concentrate feeding and low ruminal pH on methanogens and protozoa in the rumen of dairy cows[J].Microbial Ecology,2011,62(1):94–105.

[17] KONG Y H,XIA Y,SEVIOUR R,et al.Biodiversity and composition of methanogenic populations in the rumen of cows fed alfalfa hay or triticale straw[J].FEMS Microbiology Ecology,2013,84(2):302–315.

[18] 杨承剑,韦升菊,梁辛,等.利用 16S rRNA 基因克隆文库技术分析德昌水牛瘤胃产甲烷菌的多样性[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2014,40(4):382–388.

[19] SUNDSET M A,EDWARDS J E,CHENG Y F,et al.Rumen microbial diversity in svalbard reindeer,with particular emphasis on methanogenic archaea[J].FEMS Microbiology Ecology,2009,70(3):553–562.

[20] CHAUDHARY P P,SIROHI S K,SAXENA J.Diversity analysis of methanogens in rumen of *Bubalus bubalis* by 16S riboprinting and sequence analysis[J].Gene,2012,493(1):13–17.

[21] HUANG X D,TAN H Y,LONG R J,et al.Comparison of methanogen diversity of yak (*Bos grunniens*) and cattle (*Bos taurus*) from the *Qinghai*-Tibetan plateau,China[J].BMC Microbiology,2012,12(1):237.

[22] ZHOU M,HERNANDEZ-SANABRIA E,GUAN L L.Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions,as determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis analysis[J].Applied and Environmental Microbiology,2010,76(12):3776–3786.

[23] KITTELMANN S,PINARES-PATIÑO C S,SEEDORF H,et al.Two different bacterial community types are linked with the low-methane emission trait in sheep[J].PLoS One,2014,9(7):e103171.

[24] GOOPY J P,DONALDSON A,HEGARTY R,et al.Low-methane yield sheep have smaller rumens and shorter rumen retention time[J].British Journal of Nutrition,2014,111(4):578–585.

[25] REA S,BOWMAN J P,POPOVSKI S,et al.*Methanobrevibacter millerae* sp.nov.and *Methanobrevibacter olleyae* sp.nov.,methanogens from the ovine and bovine rumen that can utilize formate for growth[J].International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,2007,57(3):450–456.

[26] PURUSHE J,FOUTS D E,MORRISON M,et al.Comparative genome analysis of *Prevotella ruminicola* and *Prevotella bryantii*:insights into their environmental niche[J].Microbial Ecology,2010,60(4):721–729.

[27] BORREL G,HARRIS H M B,TOTTEY W,et al.Genome sequence of "*Candidatus Methanomethylophilus alvus*" Mx1201,a methanogenic archaeon from the human gut belonging to a seventh order of methanogens[J].Journal of Bacteriology,2012,194(24):6944–6945.

[28] POULSEN M,SCHWAB C,JENSEN B B,et al.Methylotrophic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen[J].Nature Communications,2013,4:1428.

[29] MCSWEENEY C S,PALMER B,MCNEILL D M,et al.Microbial interactions with tannins:nutritional consequences for ruminants[J].Animal Feed Science and Technology,2001,91(1/2):83–93.

[30] FRICKE W F,SEEDORF H,HENNE A,et al.The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H_2 for methane formation and ATP synthesis[J].Journal of Bacteriology,2006,188(2):642–658.

[31] CARLOLINE CHAE-HYUN K.Identification of rumen methanogens,characterization of substrate requirements and measurement of hydrogen thresholds[D].MSc.Thesis.Palmerston North:Massey University,2012.

[32] LEE J H,KUMAR S,LEE G H,et al.*Methanobrevibacter boviskoreani* sp.nov.,isolated from the rumen of Korean native cattle[J].International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,2013,63(11):4196–4201.

[33] 陶莲，刁其玉. 青贮发酵对玉米秸秆品质及菌群构成的影响[J]. 动物营养学报,2016,28(1):198–207.

Comparative Analysis of Methanogen Community in Rumen of Sika Deer (*Cervus nippon*) under Different Forages

LI Zhipeng LIU Hanlu SI Huazhe BAO Kun LI Guangyu*[2]

(*Department of Speical Animal Nutrition and Feed, Insitute of Special Animal and Plant Sciences of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun* 130112, *China*)

Abstract: The objective of present study was to compare the methanogen community in the rumen of sika deer (*Cervus nippon*) fed three common forages using the high throughput sequencing technology. Three 2-year-old male adult Sika deers with permanent ruminal cannulas were used as experimental animal in a 3×3 Latin square design, and their fed diets with oak with leaf (OL group), corn stover (CS group) and corn silage (CI group) as main forage, respectively. After one week of adaption to the diets, sika deer received each diet for 4 weeks. The primers A519F and A976R were used to amplify the V3 to V4 regions of the methanogen 16S rRNA gene. The amplicon was then sequenced on the Illumina MiSeq PE250 platform. The results showed as follows: a total of 600 352 high quality methanogen 16S rRNA gene sequences were obtained from 9 samples. These sequences were classified into 111 operational taxonomic units (OTU) based on 97% sequence similarity. Good's coverage showed that 99% of the methanogen species were represented in any given rumen sample. The results of taxonomic analysis showed that *Methanobrevibacter* spp. [OL group: （97.80±6.00）%; CS group: （97.10±1.50）%; CI group: （87.50±5.50）%] was the dominant methanogen in the rumen of sika deer. However, the distribution of methanogen at species level was different among the three groups. The relative abundance of *Methanosphaera stadtmanae* in the CI group was significantly higher than that in the OL and CS groups (P<0.05). The relative abundance of *Methanobrevibacter millerae* was increased in the OL and CI groups compared with the CS group (P>0.05). The relative abundance of *Methanobrevibacter boviskoreani* in the OL and CS groups was higher than that in the CI group

*Corresponding author, professor, E-mail: tcslgy@126.com （责任编辑 菅景颖）

(P>0.05). While, the relative abundance of *Methanobrevibacter olleyae* in the CS and CI groups was increased compared with the OL group (P>0.05). These results suggest that *Methanobrevibacter* spp. is the dominant methanogen in rumen of sika deer.

Key words: sika deer; methanogen; *Methanobrevibacter* spp.; forage